杨海乐，张辉，杜浩. eDNA监测方法标准化框架及未来图景. 湖泊科学, 2023, 35(1):12-31. DOI: 10.18307/2023.0100.

Yang Haile, Zhang Hui, Du Hao. A framework for standardizing the processes of eDNA monitoring and an accessible vision of the future. J. *Lake Sci*., 2023, 35(1):12-31. DOI: 10.18307/2023.0100.

【我们发起基于“eDNA监测方法标准化框架及未来图景”的开放知识树构建工作，欢迎领域内人人参与、人人共享、时时更新 https://kdocs.cn/l/cdV8W2iVk0wj】

eDNA 监测方法标准化框架及未来图景*

杨海乐**，张　辉，杜　浩

（中国水产科学研究院长江水产研究所，农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室，武汉 430223）

摘　要：eDNA (environmental DNA)是指从环境样品（水体、土壤、沉积物、空气、混合物等）中提取的 DNA，是各种生物的 DNA 混合物，区别于传统从单物种样品中提取的 DNA。eDNA 监测是指从环境样品中提取 DNA，用物种特异性引物或特定 DNA metabarcoding 引物对其进行扩增测序、分类学分析、相对丰度分析、功能预测等，以监测环境中是否存在某特定物种，或者获得环境中物种组成、群落结构、生态功能等相关信息。eDNA 监测主要应用在特定物种监测检出、生物多样性调查评估、群落结构和功能分析、生态系统过程分析评估等领域。eDNA 监测可以应用在陆地、水体、空气、器物表面、生物（内）表面等任何有可能存在不确定 DNA 的场景。因为 eDNA 监测的非侵入性、灵敏检出、大类群检出、易标准化方法与结果、低人力物力时间成本、结果可核查等特点，未来很有希望发展成为一个常规的物种监测、群落功能预测、生态过程分析的方法，对象可涵盖所有生境条件下的所有生物类群。但要实现这个图景，需要从普遍性和特殊性层面完成 eDNA 监测技术链条中 10 个关键环节的技术标准化：样品重复数设计、采样时间设计、采样点设计、采样方法设计、样品前处理、样品保存、扩增引物选择、DNA 提取-扩增-测序-分析程序、序列比对注释、监测结果后评估。目前来看，10 个环节的标准化基本不存在理论上的困难，并且一部分支撑标准化的研究已经启动，甚至一部分标准化的组织工作已在推进，在未来数年内有望完成关键知识、关键数据的积累，推动 eDNA 监测成为长期性周期性常规生态监测内容，支撑渐行渐近的数据驱动型科学研究和生态管理。

关键词：环境 DNA；生物信息；生物多样性监测；标准化

A framework for standardizing the processes of eDNA monitoring and an accessible vision of the future*

Yang Haile**, Zhang Hui & Du Hao

(*Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan* 430223, *P.R.China*)

---

* 2022-03-29 收稿；2022-07-25 收修改稿。

中央级公益性科研院所基本科研业务费专项（2021JC01, YFI202201）资助。

** 通信作者；E-mail：haileyang18@yfi.ac.cn。

杨海乐,张辉,杜浩.eDNA监测方法标准化框架及未来图景.湖泊科学,2023,35(1):12-31.DOI:10.18307/2023.0100.

Abstract: Environmental DNA (eDNA) is DNA extracted from any type of environmental sample (e.g. water, soil, sediment, air, mixture, etc.), which is a DNA mixture originated from different species and individuals, distinguish from a pure DNA sample extracted from a particular organism. eDNA monitoring refers the processes that 1) extracting DNA sample from environmental sample, 2) using definite species-specific primers or meta-barcoding primers to amplify and sequence eDNA sample, 3) clustering the operational taxonomic units (OTUs) and identifying their taxa against reference databases, 4) calculating the relative abundance of each OTUs/ species and other biodiversity indexes, 5) analyzing the corresponding ecosystem structure, processes or function. According to eDNA monitoring, a definite species (or other taxonomic units) in the sampling site could be identified, and the biological information about species composition, community structure, ecosystem processes, ecological function of the research area could be collected. eDNA monitoring has been applied in monitoring and early warning definite species, investigating and assessing biodiversity, detecting and analyzing community structure and function, studying and quantifying ecosystem processes and so on. eDNA monitoring could work in any type of environmental scene where there is unidentified DNA trace, such as in terrestrial environment, aquatic environment, air environment, body surface, organism (inner) surface and so on. As an emerging tool for documenting species presence without direct observation, allowing for sensitive and efficient detection, easy-to-standardize sampling and analyzing approach, comprehensive taxonomic groups coverage, less reliant on taxonomic expertise and auditable by third-party researchers, eDNA monitoring would be a prospective general method for species monitoring, community function predicting and ecosystem processes analyzing in future. Moreover, the objective scope of eDNA monitoring covers all environmental conditions and all biological taxonomies. However, to realize the prospective application vision of eDNA monitoring, there are ten crucial links that need to be standardized at both general level and definite level. 1) Design of duplicated samples for a region with definite environment conditions. The number of duplicated samples could be generally identified just using species accumulation curves. 2) Design of sampling time for a region with definite environment conditions. The interval of sampling time could be generally identified by quantifying the degradation ratio or the retention time of the eDNA from different taxonomic organisms in definite environment conditions. 3) Design of sampling sites for a region with definite environment conditions. The distance of sampling sites could be generally identified by quantifying the effective transportation distance or the spatial heterogeneity of the eDNA from different taxonomic organisms in definite environment conditions. 4) Design of sampling method. For different study areas, objects and aims, there are different optimal sample types (water, soil, sediment or other samples). Don't combine different duplicated samples, or some rare species would be omitted because of their too weak signals. 5) Pretreatment of samples. Pretreatment of samples mainly refers filtration of water samples. It's suggested that filtering water samples should use finer millipore glass fiber filter. Don't remove large particles by prefiltering water sample, or some species signals could be removed. 6) Storage of samples. It's suggested that samples could be stored at -20 or -80 centigrade, except water samples. Water samples should be kept cool in ice bath and be filtered as soon as possible. 7) Choosing of primers. The primers of metabarcoding of the *16S rRNA* gene are widely used for detecting bacteria and archaea. The primers of metabarcoding of the *ITS* and *18S rRNA* genes are widely used for detecting fungi. The primers of metabarcoding of the mitochondrial *CO1*, *12S rRNA* and *Cyt b* genes are widely used for detecting metazoan. Metagenome is another choice for identifying species. 8) Experiment processes of DNA extraction, amplifying, sequencing and analyzing. As the experiment processes are more and more tending to be processed by commercial biolabs, a set of general experimental parameters is

needed. 9) Taxonomic identification of OTUs. Good reference databases, either comprehensive reference databases or local customizable reference databases, are required. 10) Post-evaluation of results. Post-evaluation of results mainly pays attention on whether the number of duplicated samples is sufficient, whether the frequency of sampling is suitable, whether the spatial distance between sampling sites is suitable, whether the taxonomic identification of OTUs is accurate. Until now, there is no theoretical difficulty in standardizing these ten crucial links. Now, the mainly work is the accumulation of datasets and knowledge. Some studies on supporting the standardization have been processed. Parts of standardizing works have been organized both at home and abroad. We expect that the accumulation of crucial datasets and knowledge on eDNA monitoring in hot regions could finish in future several years, and then the eDNA monitoring could be a general work, even a long term basic work in hot regions. As the eDNA monitoring could produce comprehensive and standard datasets, along with the long term basic work of eDNA monitoring realizing, the long time series datasets could be used to detect the biodiversity (especially hiddenbiodiversity) variations and study the dynamic and evolution of ecosystem structure, processes, function and health. Moreover, we expect a series of datasets with high quality, rigour, availability and transparency in future to support the open science and the data-intensive scientific discovery and ecosystem management.

Keywords: Environmental DNA; biological information; biodiversity monitoring; standardization

1 eDNA 及其应用领域

eDNA (environmental DNA)是指从环境样品（水体、土壤、沉积物、空气、混合物等）中提取的 DNA，是各种生物的 DNA 混合物，区别于传统从单物种样品中提取的 DNA[1-2]。eDNA 包括来自活的细胞和生物的胞内 DNA，以及来自自然死亡细胞及细胞结构破碎后所释放出来的胞外 DNA[1]。

eDNA 的应用最早可追溯到 1987 年对沉积物中微生物的研究[3]，但正式兴起则要到 2000 年之后[1]。应用 eDNA 的研究早期主要针对微生物类群，扩展到其它生物类群（比如动物）则要略晚几年[4]，随着二代测序(next-generation sequencing)和 DNA (meta)barcoding 技术的发展，生态学中应用 eDNA 的研究逐渐增多[1,5]，近年来 eDNA 的应用更是在微生物生态学[6-8]、生态系统生态学[9]、古生态学[10-11]、保护生物学[12]、入侵生物学[13]、特定类群监测[14-15]、生物多样性监测[16-19]等各个研究领域中快速发展[20-21]，样品类型覆盖土壤[8,22]、水体[6,22]、沉积物[10-11]、气溶胶及碎屑浮尘[23-24]、动物粪便[25-26]、动物肠道[27-30]、动植物体表[27-28,30]等，目标类群涉及微生物[6-8,27,29]、浮游生物[31-32]、真菌[33-34]、植物[35]、低等无脊椎动物[14,19]、软体动物[36-37]、节肢动物[38]、鱼类[39-41]、两栖爬行类[41-42]、鸟类[23-24]、哺乳类[15,18]等几乎所有生物类群（表 1）。

表 1 eDNA 应用概述

Tab.1 Summary of the eDNA usage in different study fields, samples and taxonomies

研究领域	概述
微生物生态学	对来自水体、沉积物、土壤、空气、混合物、生物共生的微生物的 eDNA 进行提取、扩增子测序或宏基因组测序，研究微生物的多样性、群落结构、群落动态、空间分布、营养代谢等。
生态系统生态学	通过监测相关介质（水体、沉积物、土壤、空气、混合物、生物共生）的 eDNA，对目标生态系统内的生物组成结构、相对丰度及其时空变化迁移过程、功能演替等进行研究。
古生态学	通过对来自冰芯、沉积物、埋藏品、包藏品等介质中的 eDNA 进行研究，获得历史上或地质历史上的生物多样性组成、生态环境状况、生态演化事件等信息。

保护生物学	通过对来自相关介质（水体、土壤、空气等）的 eDNA 监测相关目标物种的分布和种群变化，通过对目标群体排泄物 eDNA 的监测评估目标群体的摄食状况、健康状况，为保护行动提供基本信息。
入侵生物学	通过对来自相关介质（水体、土壤、空气等）的 eDNA 监测相关目标物种的分布和种群变化，为入侵生物预防和控制提供基本信息。
特定类群监测预警	通过对来自相关介质（水体、土壤、空气、混合生物样等）的 eDNA 监测寄生虫、流行病的病菌病毒等的分布、传播等，为相关防控和治疗提供基本信息。
生物多样性监测	通过监测相关介质（水体、沉积物、土壤、空气、混合物、生物共生）的 eDNA，对目标群体的生物多样性进行监测评估。
样品类型	
土壤样品	以监测土壤微生物为主，也有用以监测陆生动植物、研究生态系统过程。
水体样品	以监测水生动物、植物、浮游生物、微生物为主，也有用以监测流域内陆生动植物、研究流域过程。
(鱼类)浮游生物样品	以监测水体浮游动植物及水生动物早期资源为主，也有用于水生态环境状况评估、产卵场调查等。
沉积物样品	以监测底层鱼类、底栖动物、微生物为主，也有用以研究（地质）历史时期生物组成、生态环境状况。
气溶胶及碎屑样品	以监测陆生动植物、环境微生物为主，也有用以研究大气生物悬浮物和气溶胶动力过程。
动物粪便样品	以监测动物食性和肠道微生物为主，也有用以监测寄生虫，以及开展健康评价。
动物肠道样品	以监测动物食性和肠道微生物为主，也有用以监测寄生虫，以及开展健康评价。
动植物体表样品	以监测动植物体表共生微生物为主，也有用以监测寄生虫、小型捕食者等。
目标类群	
细菌和古菌	主要用 *16S rRNA* 基因扩增子测序，也有用宏基因组的。
蓝藻	主要用 *16S rRNA* 基因扩增子测序，也有用 *ITS* 基因的。
浮游生物	主要用 *CO1* 基因和 *18S rRNA* 基因扩增子进行测序。
真菌	主要用 *ITS* 基因扩增子测序，也有用 *5.8S rRNA* 基因的。
维管束植物	主要用 18S rRNA 基因扩增子测序，也有用叶绿体 *RbcL* 基因的。
低等无脊椎动物	主要用 *CO1* 基因扩增子进行测序，也有用 *18S rRNA* 基因和 *16S rRNA* 基因的。
软体动物	主要用 *CO1* 基因扩增子进行测序，也有用 *16S rRNA* 基因的。
节肢动物	主要用 *CO1* 基因扩增子进行测序，也有用 *Cyt B* 基因的。
鱼类	主要用 *CO1* 基因和 *12S rRNA* 基因扩增子进行测序，也有用 *Cyt B* 基因和 *16S rRNA* 基因的。
两栖爬行类	主要用 *CO1* 基因扩增子进行测序，也有针对特定物种用分子探针来进行检出的。
鸟类	主要用 *CO1* 基因扩增子进行测序。
哺乳类	主要用 *CO1* 基因扩增子进行测序。

eDNA 在各研究领域中的应用，核心一环是利用 eDNA 对相关生物类群实现信息监测检出及其相对丰度的定量[12-13,16,43-44]。eDNA 作为标识特定生物存在与否及其相对丰度的指征信号，可以在两个维度发挥功能，1）指征 DNA 来源物种本身的存在及其相对丰度，2）指征 DNA 来源物种紧密相关的其它物种或生态环境状况[45]。

2 eDNA 监测技术发展的 4 个阶段

eDNA 监测技术的发展可划分为技术探索、技术验证、技术标准化、技术常态化应用 4 个阶段（图 1）。第一次利用沉积物中的 eDNA 开展微生物研究[3]，开启了 eDNA 监测的技术探索阶段；二代测序和 DNA (meta)barcoding 技术的成熟实现了 eDNA 监测技术可用[5]，开启了 eDNA 监测的技术验证阶段，推动了 eDNA 监测在各领域研究中验证性应用（表 2）[18-19,23,43,46-47]；随着 eDNA 监测可行性在各领域研究中获得验证，

同时也认识到 eDNA 监测结果受各种因素影响[48-50]，为了夯实基于 eDNA 监测的研究结果的有效性，开始研究 eDNA 监测的技术标准[22,40,51]、呼吁 eDNA 监测的规范化[52-53]、尝试为 eDNA 监测制定技术标准[54-55]，开启了 eDNA 监测的技术标准化阶段；经过技术发展和知识积累，在 eDNA 监测完成技术标准化后，eDNA 监测将进入诸多学者所预期的技术常态化应用阶段[10,13,16-17]。

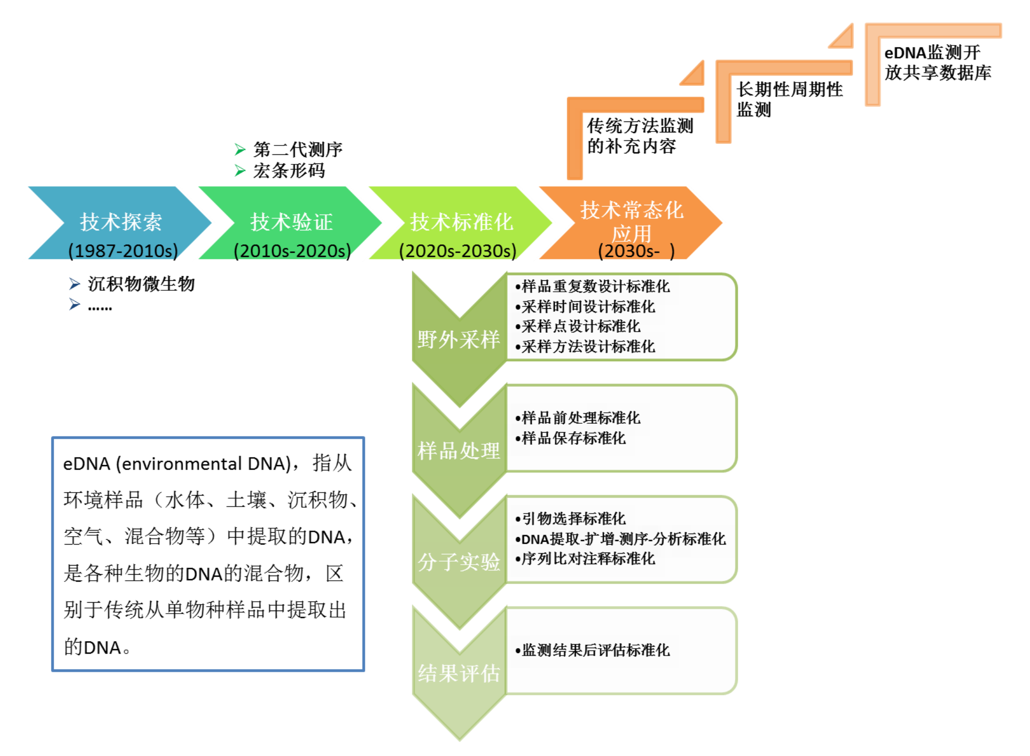


图 1 eDNA 监测的 4 个发展阶段

Fig.1 Four development stages of eDNA monitoring

表 2 eDNA 监测在各领域研究中的验证性应用

Tab.2 The test of eDNA monitoring in different study fields

eDNA 的验证性应用	案例
指通过实验确认 eDNA 在某一具体研究领域研究方向中可用且可以达到预期研究目的。相关研究案例非常非常多，此处只引数篇文献以做示意说明。	Ji 等验证了通过 eDNA 的 metabarcoding 分析可以进行生物多样性的监测与评估[43]
	Bass 等验证了通过水体 eDNA 可以进行寄生虫的监测和预警[46]
	Deiner 等验证了用河流水体 eDNA 可以同时监测到来自陆地和水体的生物信息[47]
	Carraro 等验证了用河流水体 eDNA 可以估算物种分布及其丰度[19]
	Sales 等验证了用河流水体 eDNA 可以大范围监测陆生及涉水哺乳动物[18]
	Lynggaard 等验证了用空气传播的 eDNA 可以监测陆生脊椎动物群落[23]

就当前来看，基于 eDNA 监测的研究整体上处于技术验证向技术标准化过渡的阶段。当前基于 eDNA 监测的研究多属于技术验证的研究[18,56-59]，只有少部分可归类为技术标准化的技术和数据积累的研究[22,40,60]。鉴于 eDNA 监测技术可以实现非接触、无损伤、高灵敏度、低人力物力时间成本消耗的多物种（或高级分类单元）监测的应用优势[47,61-63]，可以预见未来数年内，在一些当前大家比较关注的问题上，技术

和数据积累可能很快就能完成。近年来，国外[54-55]和国内[1]陆续有 eDNA 监测技术标准化文件/手册推出，其已经集中关注了采样点（河流、湖泊、库塘等）选择、样品（水、沉积物、生物膜、混合生物样等）采集与处理、eDNA 提取、eDNA 分析（扩增、测序、注释、统计）等内容。这些 eDNA 监测技术标准化努力推动了 eDNA 监测技术标准化的进步，但在其所关注的内容中还依然存在不少问题有待解决[51]，并且还有一部分问题未受到应有的关注。也就是说，在一些未被关注的问题的标准化研究和数据积累上，或有可能掉队，进而延误整个技术标准化的发展。因此，一个针对 eDNA 监测技术标准化的系统性整体框架是非常必要的，将有助于推动 eDNA 监测技术尽快发展到技术常态化应用阶段。

3 eDNA 监测技术标准化的系统性整体框架

针对 eDNA 监测技术标准化的系统性整体框架的需求，本文借鉴文献中所指出的 eDNA 监测技术中可能面临的一系列问题[12,17,48-50,52]，并对 eDNA 监测技术流程进行系统化梳理（图 2），提出 eDNA 监测技术标准化中所需重点关注和解决的 10 个环节（图 1）：样品重复数设计、采样时间设计、采样点设计、采样方法设计、样品前处理、样品保存、扩增引物选择、样品提取-扩增-测序-分析程序、序列比对注释、监测结果后评估，并就此进行简要说明和分析。

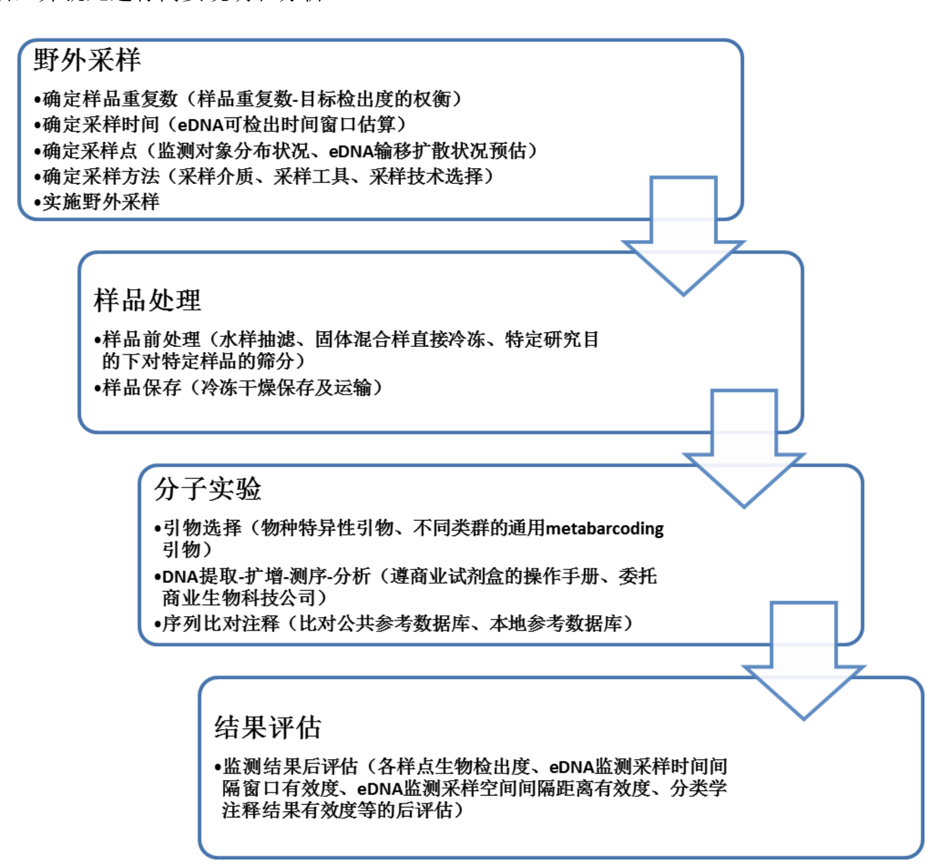


图 2 eDNA 监测技术流程

Fig.2 Technological process of eDNA monitoring

[1] http://www.chinacses.org/xw/gsgg/202205/t20220516_982140.shtml

该系统性整体框架主要针对基于 eDNA metabarcoding 技术路径的 eDNA 监测方法。基于 eDNA 监测技术发展历程和未来应用图景，我们判断未来 eDNA 监测技术发展应用将是以基于 eDNA metabarcoding 的技术路径为主，以非基于 eDNA metabarcoding 的技术路径为辅，同时考虑到非基于 eDNA metabarcoding 的技术路径的 eDNA 监测技术流程比基于 eDNA metabarcoding 的技术路径的 eDNA 监测技术流程只在"扩增引物选择、样品提取—扩增—测序—分析程序、序列比对注释" 3 个环节有差异或省略，所以本文着重阐述基于 eDNA metabarcoding 技术路径的 eDNA 监测方法的标准化框架，兼顾非基于 eDNA metabarcoding 技术路径的 eDNA 监测方法的标准化框架。

3.1 样品重复数设计

eDNA 监测样品重复数设计的核心是样品重复数与目标检出度之间关系的测算。eDNA 监测属于抽样调查，抽样重复数越多检出的信息种类数也越多（同时，检出的信息相对丰度结构也越稳定），这种增加遵循物种积累曲线的对数增长基本规则，所以会存在一个样品重复数和目标检出度之间的相对优化的投入产出点[40]。比如，在长江武汉江段开展的鱼类 eDNA 监测中，10 个重复可以实现近 80%的鱼类物种检出度目标，13 个重复可以实现近 90%的鱼类物种检出度目标，17 个重复可以实现近 95%的鱼类物种检出度目标[40]。在长江武汉江段开展的环境微生物 eDNA 监测中，8 个重复可以实现近 80%的细菌物种检出度目标，17 个重复可以实现近 90%的细菌物种检出度目标，28 个重复可以实现近 95%的细菌物种检出度目标[29]。

样品重复数设计，主要是在一个相对狭小的时间和空间内，通过对采样时间和采样空间的离散设计，以随机抽样假重复的方式采集一系列样品，通过样品的处理、测序、分析、注释、物种积累曲线分析，计算最大可检出物种（OTUs (operational taxonomic units)）数的最优估值，获得样品重复数和目标检出度之间的量化关系，然后根据一定的检出度目标，确定 eDNA 监测所需的样品重复数[40]。针对单物种监测的样品重复数设计，可以根据一系列重复抽样监测中目标物种群体的检出频次，进行基于 0/1 随机抽样模型的概率计算来确定样品重复数和目标检出度的关系。

样品重复数设计的标准化原理简单，只需要在各具体区域针对各具体目标类群在各具体环境条件范围内开展实验积累数据，建立标准参考库，然后根据特定目标检出度确定样品重复数，或者根据样品重复数—目标检出度关系选取具有最优投入产出的样品重复数。

3.2 采样时间设计

eDNA 监测采样时间设计的核心是监测时间有效度测算。因为 eDNA 在环境中存在一定的持留时间[60,64]，所以 eDNA 监测的采样时间设计需要解决两个问题：1）怎么避免前后两次采样监测到的是同一批信号源，2）怎么避免出现大的监测时域空缺，这需要对 eDNA 的监测时间有效度进行量化测算。

监测时间有效度，指在监测区域内监测目标群体的 eDNA 降解至不可检出的时间。不可检出取决于两个层面的因素：eDNA 片段降解至短于监测扩增片段长度[65]，可检出 eDNA 片段的浓度降解或稀释至低于检出限[66]。由于监测时间有效度受 eDNA 初始片段长度、初始浓度、降解速率等的影响[60,64]，eDNA 的释放形态和释放率存在较强的类群差异性[67]，eDNA 降解速率受来源（生物类群）[67]、形式（胞内胞外）[68]、初始浓度[69]、温度[70-72]、介质[73]、BOD[69]、营养状况[68,70]、pH[72,74]、紫外线[72]、叶绿素[69]、环境微生物[65]

及胞外酶等因素影响[20,75]，监测时间有效度呈现出物种差异性、类群差异性、季节差异性、环境特征差异性等特征[60,76]。

在陆地上和静水水体中（以及其它的一些类似情况，比如附着于器物表面），采样时间设计，主要是在一个具体环境条件下，对实际目标生物类群密度条件下所产生的 eDNA 的降解过程进行定量。因为 eDNA 的降解存在一个指数降解的规律[20,69-70,77]，所以可以用半衰期来进行定义[65]。因为生物个体所释放的 eDNA 都是从大片段降解为小片段再降解为更小的片段，因而 eDNA 长片段的半衰期比短片段的半衰期更短[64-65,78]，用长片段引物比用短片段引物进行 eDNA 监测时的时间窗口更小。

在流水水体中和强烈受流域过程影响的陆地上（以及其它的一些类似情况，比如受空气流动而传播的气溶胶和碎屑浮尘），采样时间的设计，不仅仅需要考虑 eDNA 降解过程，还要考虑 eDNA 在水体、沉积物、土壤、空气等采样目标介质中的持留时间。在径流、气流的侵蚀、搬运过程影响下，eDNA 会在尚未完全降解的情况下被输移到其它地方[79-82]，进而导致原位事实上的 eDNA 不可检出，因而这种情况下的采样时间设计就要考虑 eDNA 持留时间这一参数，而非单纯的降解过程。

采样时间设计的标准化影响因素复杂，但针对常规应用的标准化方法简单，只需要在各具体区域针对各具体目标类群在各具体环境条件范围内开展实验积累数据，建立标准参考库，然后根据相应监测时间有效度确定监测采样时间间隔。

3.3 采样点设计

eDNA 监测采样点设计的核心是监测空间有效度测算。因为 eDNA 在环境中存在一定的持留时间[60,64]，受径流、气流、扩散等的驱动以及动物携带传播而存在一定的空间迁移[9,75,83]，所以 eDNA 监测的采样点设计需要解决两个问题：1）怎么避免两个采样点监测到的是同一个信号源，2）怎么避免出现监测区域大的空间空缺，这需要对 eDNA 的监测空间有效度进行量化测算。

针对流水系统中的 eDNA 监测，有学者提出用基于水文学模型，考虑 eDNA 降解速率以及各环境因子，通过模型模拟计算来设计 eDNA 监测的最适采样方案[84]。这属于通过受控实验明晰环境因子对 eDNA 输移、降解过程中各环节的影响[85-86]，再通过各环境因子的参数化、eDNA 输移降解过程各环境的模型化来实现对 eDNA 监测的最适采样方案设计的思路[75]。另外一个思路，即暂时先把 eDNA 产生、输移、降解等的复杂过程（各物种的 eDNA 形成参数、各物种 eDNA 的降解速率参数、各环境要素对 eDNA 降解的影响参数）打包成黑箱，接受不确定性、控制不确定性、量化不确定性，通过对 eDNA 输入端和输出端关联性的量化分析，实现对 eDNA 监测的最适采样方案设计，这是我们所提出的流域生物信息流分析框架的处理问题方式[9,22]。由于该思路所需确定的背景变量少、所需预先开展的计算简单，虽然精确度可能不太高但也应该够用，比较适合大范围推广使用。

因为 eDNA 的降解存在指数降解的规律[20,69-70,77]，在流水水体中 eDNA 的监测空间有效度可以用无效生物信息流（用来标记没有生命活性的生物物质，亦即来自自然死亡细胞及细胞结构破碎后所释放出来的胞外 DNA）的半衰距离来量化[22]。因为依赖于 eDNA 的降解速率以及由径流驱动的运输、吸附与沉积、再悬浮等过程[75,79-82]，其中 eDNA 的降解速率受来源（生物类群）[67]、形式（胞内胞外）[68]、初始浓度[69]、

温度[70-72]、介质[73]、BOD[69]、营养状况[68,70]、pH[72,74]、紫外线[72]、叶绿素[69]、环境微生物[65]及胞外酶等因素影响[20,75]，无效生物信息流半衰距离会呈现出物种差异性、类群差异性、季节差异性[22]，以及基于河流特征的区域性差异。比如，在青藏高原一个小型河流中，春季封冻期的细菌无效生物信息流半衰距离为 1.5 km 左右，秋季多云天的细菌无效生物信息流半衰距离为 10.5 km 左右，夏季降雨天的细菌无效生物信息流半衰距离为 14.5 km 左右，而夏季降雨天的真核生物无效生物信息流半衰距离为 4.5 km 左右[22]。因为样品重复数对流域生物信息流的估算准确度和精密度有影响[87]，所以采样点设计需要基于具体样品重复数所指向的目标检出度进行，并通过后验概率检验来对 eDNA 监测空间有效度进行评估。

在静水水体中 eDNA 的监测空间有效度往往依赖于水体内监测目标类群的空间分布以及 eDNA 在水体中的扩散方向和范围，监测空间有效度可以用 eDNA 空间分布差异度和 eDNA 矢量化有效扩散距离来量化。比如，在不同规模（面积分别为 3、122 和 4343 hm^2）的湖泊中的 eDNA 监测研究显示，近岸水体 eDNA 样品检出的鱼类物种数比湖中水体 eDNA 样品检出的鱼类物种数和多样性高，且大多数物种相同[88]。在海洋中的 eDNA 监测研究显示，受水体垂直分层和水生生物群落结构的垂直分层影响，采样点也需根据需要进行分层设置[89]。

对陆地生物的 eDNA 监测的采样点设置，可以基于由陆地到水体的流域生物信息流的框架通过河流水体 eDNA 来监测[9]，也可以比照静水水体中 eDNA 监测框架来开展，只是需要将 eDNA 在水体中的扩散过程替换成陆地动物移动/携带扩散和风力驱动扩散过程。比如，在青藏高原一个小流域中，离岸 5 m 内的陆地土壤 eDNA 中检出的细菌可以在河流水体中检出的比例，在春季封冻期为 16.6%，秋季多云天为 48.1%，夏季降雨天为 62.8%，真核生物的检出普遍要低一些，夏季降雨天的真菌检出比例为 44.7%，后生动物的检出比例为 22.6% [22]。

对附着于器物或者生物个体（内）表面的 eDNA 监测的采样点设置，主要依赖于对所监测目标 eDNA 分布的预判，而这个目标 eDNA 由监测或研究目的所决定。比如监测动物的肠道微生物，采样点为动物肠道（有的会区分前肠、中肠、后肠）或者其所延伸的排泄物[25,27-30]；监测动物的体表共生微生物，采样点为动物皮肤或者特定器官/区域的外表皮[27-28]。

采样点设计标准化的影响因素复杂，对于存在明确 eDNA 空间输移的情况，可以选择黑箱处理方法，基于流域生物信息流分析框架，计算 eDNA 监测的空间有效度，并对其进行概率检验；对于不存在明确 eDNA 空间输移的情况，可以借鉴生态学中经典的种—面积曲线思路，基于均匀采样设计来量化采样点间距或采样数量与目标检出能力的关系。具体标准化工作只需要在各具体区域针对各具体目标类群在各具体环境条件范围内开展实验积累数据，建立标准参考库，然后根据相应监测空间有效度确定监测样点。

3.4 采样方法设计

对不同地区、对象、目的，eDNA 监测需要选取不同的样品类型（水体、沉积物、土壤、动物粪便、大型昆虫、物体表面附着物）或样品类型组合。因为生物在分布区域内不同样品介质中的 eDNA 存留会存在明显差异，不同样品介质对不同的生物 eDNA 的持留方式、持留能力和持留时间也会存在明显差异，环境条件也会对这两类差异产生显著影响，进而导致不同的样品类型所保存的类群不一样，或对各类群的覆

盖度不一样，所以在相关监测工作中，要注意选择最适样品类型（组合）进行采样。比如，一个对澳大利亚（印度洋和南大洋）和哈萨克斯坦（里海）港口的 eDNA 监测研究显示，来自表层水、沉积物、沉降盘、浮游拖网的 eDNA 样品检出的真核生物类群具有明显分异，不同类型样品 eDNA 监测到的真核生物类群存在系统性互补[90]。在对西澳大利亚的高温荒漠气候的 Pilbara 和高温地中海气候的 Swan 海岸平原的陆生生物 eDNA 调查研究中发现，食肉动物粪便 eDNA 样品比土壤 eDNA 样品能够检出更多的植物和无脊椎动物类群（科级别）[91]。沉积物中的 eDNA 降解速率比水体中的 eDNA 降解速率要慢、持留时间要长，同样体积的样品，沉积物中累积的 eDNA 浓度比水体的要高、时间跨度比水体的要长[73,92]，这可为不同监测目标下的样品类型选择提供参考。因为地上节肢动物留在植物叶面的 eDNA 容易受雨雾冲刷而下落[93]，所以林间节肢动物 eDNA 监测建议采集植物冠/叶下的露水、雨水或者表层土壤样品。

野外采样量一方面取决于样品类型和 eDNA 监测目标，另一方面取决于 eDNA 提取过程中样品的最大使用量。当前 eDNA 提取最常用并越来越常用的试剂盒法中，eDNA 提取所使用的样品量通常不超过 1.5 mL。所以对于不需要预处理且能够大量采集的沉积物样品、土壤样品等，可以用 5 mL 无菌离心管采集 3~5 mL 样品[22]，根据需求可增加样品重复数；对于不需要预处理但样品较不易采集的生物肠道样品、生物体表黏膜样品、物体表面附着物样品、气体悬浮物沉降样品等，可以用 2 mL 无菌离心管采集 0.5~2 mL 样品[27,29]，根据需求可增加样品重复数；对于需要通过抽滤来富集 eDNA 的水体样品，目前多以 1.5 L 为量（不同研究不同标准对这一量的要求有所差异），在不同水体状况和孔径滤膜条件下，抽滤完所有水样可能需要使用多张（1~5）滤膜，多张滤膜在 eDNA 提取时可以作为一份样品一次性提取[22,29]，根据需求可增加样品重复数；对于需要通过抽滤来富集 eDNA 的气溶胶及碎屑浮尘样品，可以基于研究区域的空气悬浮物状况来确定抽滤空气的时间（0.5~2 h）[23-24]，根据需求可增加样品重复数。

不同样品（样品重复）不要混样。因为 eDNA 监测采样的随机抽样特性以及 eDNA 在介质中非均一分布特性，各样品中所包含的各物种的 eDNA 丰度不一，丰度超过检出阈值的物种大概率会被检出，低于检出阈值的大概率不会被检出，所以各样品中所检出的群落结构也不一，一个样点所有样品的检出结果（在分析过程中）合并在一起可以更贴近事实地反映其群落结构状况；而不同样品进行混样（但不进行 eDNA 富集操作）会稀释某个样品所偶然抓住的某低资源量物种超过检出阈值的 eDNA 丰度，导致一系列低资源量物种的 eDNA 丰度低于检出阈值，进而导致检出结果的系统性误差。综合分析已有的 qPCR 实验研究，不同实验室不同研究条件下的 eDNA 检出限（limits of detection）在 4~250 个拷贝每个反应（拟合结果范围略有扩张，2.19~260），eDNA 量化限（limits of quantification）在 10~1920 个拷贝每个反应（拟合结果范围略有左偏，6~839）[66]。有案例研究也证实，基于各样点样品单独测序结果的物种累计曲线比基于各样点样品混合样重复测序的物种累计曲线所获得的物种数和多样性要高[88]。

3.5 样品前处理

样品前处理主要是指对水样的处理以获得富集的 eDNA 样品，因为通常情况下土壤、沉积物、固体混合物、痕迹样品采集后直接密封冷冻即可。最高效的水样预处理方式是过滤，不同的过滤方式所得到的结果差异不大，但过滤用的滤膜孔径规格和滤膜材质对结果有明显影响：孔径越小所捕捉到的 eDNA 类群越

多，其代价是过滤时间越长，在实践中需要根据监测目标的形态（病毒、细菌、浮游生物、宏体生物碎片、游离 DNA）进行权衡；对于滤膜材质，有研究显示用河流和湖泊水体 eDNA 监测真核生物，玻璃纤维滤膜比树脂滤膜的过滤效果好，纤维素酯滤膜比聚醚砜滤膜的过滤效果好[94-96]。

不建议对水样进行预先过滤（除了为富集某特定类群 eDNA 而进行的筛分）。一些研究对较浑浊水样进行预先过滤以去除大颗粒杂质，然后用微孔滤膜过滤获得细颗粒的 eDNA 样品，但考虑到大颗粒杂质对于用微孔滤膜进行过滤不会产生特别大的影响，以及预处理在除去大颗粒杂质时也会去除相当一部分被大颗粒杂质吸附的目标 eDNA，所以对悬浮颗粒较多、泥沙含量较高或富营养化的水体可进行分样处理（通过静置或离心将颗粒物进行富集形成沉淀物样品，按照沉积物样品的处理方式进行 eDNA 提取，上清液进行抽滤形成滤膜上的样品，进行 eDNA 提取），也可以延长抽滤时间、压缩抽滤水体体积、增加样品的重复数，但不建议对水样进行预先过滤。一项对海洋浮游动物群落结构的案例研究确证了经过预先过滤的 eDNA 样品中所检出的生物类群显著少于未经预先过滤的 eDNA 样品中所检出的 [97]。因为预先过滤并不降低样品污染、测序错误的可能性，所以减少的生物类群大概率是稀有物种/类群。eDNA 监测的主要目的和优势之一是对稀有物种的检出，而非对传统方法能够轻易得出的结果进行重复验证，所以不进行水样预先过滤的代价是值得的。

对于部分特定目的或针对特定类群的非水体 eDNA 监测，也可以通过样品前处理来提高监测效率。比如，对在两个鲑鱼养殖场采集的 84 个底泥样品分组进行筛分对比实验，非筛分样品中后生动物序列(metazoan reads)的平均百分比分别为 19.53%和 17.10%；筛分样品中后生动物序列的平均百分比分别为 81.03%和 89.92%[98]。筛分有效地清除了硅藻门类群（如海藻和浮游植物），富集了后生动物。筛分样品中 eDNA 测序中底栖动物平均占比在一个样点是未筛分样品的 4.1 倍（47.29% vs 11.46%），在另一个样点是未筛分样品的 5.7 倍（20.03% vs 3.52%）[98]。

3.6 样品保存

样品保存主要指样品从被采集到 DNA 提取之间的这段时间的保存。对于不需要预处理的样品（比如土壤、沉积物、固体混合物、痕迹等）最有效且便捷的方法即-80℃、-20℃或干冰浴冷冻保存。对于水样，冰浴保存可以降低 eDNA 在水中的降解速率[99]，也有用阳离子表面活性剂来抑制水体中 eDNA 降解[100]，但是不如低温保存有效[101]。当然，最有效的还是尽快进行过滤，把 eDNA 富集在滤膜上，然后干燥冷冻（-80℃、-20℃）保存[96]。

3.7 扩增引物选择

扩增引物，根据 eDNA 监测的对象和目的选择用物种特异性引物或者 metabarcoding 通用引物。物种特异性引物主要针对特定物种的 eDNA（快速）监测检出与定量（比如病源监测、入侵物种监测、濒危物种监测等），metabarcoding 通用引物主要针对目标生物类群的 eDNA 监测检出（比如对细菌、鱼类、植物、真核生物等的物种组成监测）[49]。不同类群往往有不同的常用通用引物（比如真菌常用 *ITS*、*18S rRNA* 基因的通用引物，细菌、古菌常用 *16S rRNA* 基因的通用引物，后生动物常用 *CO1*、线粒体 *12S rRNA*、*Cyt b* 基因的通用引物）。不同通用引物之间，有一定的扩增类群范围、类群内扩增比例、物种/遗传辨识度差异

[102-104]。传统通用引物在越来越多的使用中逐渐形成大势并不断积累数据，同时也有不少新的通用引物被开发出来[35,105-106]，但新开发通用引物是否真的好用，是否有足够的优势替代已塑造了一定程度路径依赖的传统通用引物，还有待实践和时间检验。

对于鱼类，针对线粒体 *12S rRNA* 基因的通用引物比针对 *CO 1* 基因的通用引物有更好的检出效果[104,107]。当前的状况是，针对线粒体 *12S rRNA* 基因的通用引物检出结果可重复性高，但数据库不全；针对 *CO 1* 基因的通用引物检出结果可重复性低，但数据库全[107]，因而当前用 *CO 1* 的通用引物还是更普遍一些。随着线粒体 *12S rRNA* 数据库的完善，线粒体 *12S rRNA* 的通用引物之后或将是一个重要的可选项。由于当前各 metabarcoding 通用引物对目标类群的扩增都存在一定的效率缺陷，使用多个通用引物分别进行扩增测序分析，并对结果进行并联分析能够一定程度上缓解部分覆盖缺陷问题，但是否能够彻底解决覆盖缺陷问题、是否能够准确反映群落结构尚未确定。

对样品进行环境宏基因组(metagenome)测序并系统注释，也是一种检出方式[108]。宏基因组测序能够覆盖各生物类群，所得的数据量大得多，但成本却高得多，结果的精确度和覆盖度也未确定，目前在微生物上用得多，在其它类群中用得非常少，需要根据实际需求进行选择，并对类群覆盖度和注释效率进行相应定量评估。

3.8 样品提取—扩增—测序—分析程序

对每一类样品，应该有标准化的 eDNA 提取—扩增—测序—分析程序。因为 eDNA 提取方法和具体操作程序、PCR 扩增的退火温度和循环数、测序平台和测序技术、分析流程和具体参数都会对最后所解析出来的 OTUs 丰度评估产生一定影响，所以只有统一标准化的 eDNA 提取—扩增—测序—分析程序，其最后所得的结果之间才具有完全的可比性[109]。对于具体的 eDNA 提取方法，有学者提出特定改进方案[110]，但用商业试剂盒是越来越普遍的方式[111]。从现状来看，从 eDNA 商业试剂盒提取、eDNA 样品质量检测，到 PCR 扩增、PCR 产物质量检测、PCR 产物提取与纯化、PCR 产物定量，再到 DNA 文库构建、测序、序列数据质控、OTU 聚类、OTU 丰度统计[22]，包括其中各个步骤的污染控制、参数设置及调优，商业生物技术公司都有一整套标准化技术流程及数据处理软件，并在为非常多的 eDNA 相关研究提供技术服务支持。从目前趋势可以预见，样品提取—扩增—测序—分析一整套都委托给商业生物技术公司也将是未来的一个重要选项和趋势[112]。

虽然由商业生物技术公司执行的 eDNA 样品提取—扩增—测序—分析程序在执行过程中由公司技术人员不断技术参数调优进而逐渐趋于标准化，但还存在两个细节问题尚待解决并值得注意：1）扩增当中的引物偏好问题。该问题的存在比较普遍，并且是对群落结构定量产生重要影响的技术误差来源[113]，这个问题的解决一方面需要开发更好的偏好性更小的通用引物来缓解，另一方面也可以通过定量引物偏好，对整体结果进行模拟和逆向校正。2）分析当中的 OTU 聚类的参数设置问题。该问题是一个比较直观的问题，OTU 聚类时序列相似度设置越高，聚类形成的 OTU 数目就越多，进而可能影响到后续的序列比对和分类学注释。这是一个计算量和结果精确度的权衡，可以在算力允许的情况下自己调试合适的参数，比如 97%、99%、99.9%。

对序列的分析，除了 OTU 聚类分析路径之外，ASV (amplicon sequence variant)降噪分析路径也在逐渐获得相关研究者的关注。从 OTU 聚类分析路径和 ASV 降噪分析路径单独使用比较来看，聚类及注释结果各有优缺点，比如针对 CO1 基因所得聚类 OTUs 和降噪所得 ASVs 差不多，并且注释所得分类单元也差不多，而针对 18S 基因所得聚类 OTUs 明显比降噪所得 ASVs 要多，并且注释所得分类单元也要多[103]。有研究提出 OTU 聚类分析路径和 ASV 降噪分析路径不应该是相互替代的，而是相互补充的，建议用 ASV 来指示单倍型，用 OTU 来指示物种，避免相关信息丢失，进而提高不同研究间的可加性和可比性[114]。聚类分析路径和降噪分析路径都有不止一种算法[115-116]，相应类别之内的算法在使用中或多或少可互相混合、折中和交换[114]，在标准化过程中建议选定一种或几种简易有效的算法进行计算和结果展示。

对于针对特定物种的 eDNA（快速）监测检出与定量，往往只需要使用物种特异性引物进行 PCR 定性检出和 qPCR 或 ddPCR 定量分析[49]，不需要进行测序、序列分析、序列比对注释等步骤环节。使用物种特异性引物进行 qPCR 或 ddPCR 定量分析，主要是进行 eDNA 相对丰度的定量，因为 eDNA 相对丰度在一定条件下和目标物种的个体数量呈线性正相关[117-118]，进而可被用来开展鱼类自然繁殖监测[59]。通过 eDNA 定量分析可以为各物种/类群的 eDNA 释放速率、eDNA 降解速率、eDNA 浓度与个体数量关系等进行数据积累，进而为未来用模型根据 eDNA 浓度模拟计算目标类群个体数量或资源量提供数据库支持。

3.9 序列比对注释

序列比对注释的关键在于参考数据库的建立与完善。对于特定目标物种的监测（比如特定珍稀濒危物种监测、入侵种监测、寄生虫监测等）只需要通过物种特异性引物进行 PCR 扩增检测确认即可，无需进行测序和序列比对[13]；如果需要对特定目标进行种群遗传结构分析和系统发育分析，则需要进行测序和相关序列分析。对于大类群目标的监测则需要特定的序列参考数据库，比如真菌的 *ITS* 基因 Unite 数据库、18S rRNA 基因 Silva 数据库，细菌和古菌的 16S rRNA 基因 Silva 或 Greengene 数据库，后生动物的线粒体 *CO1* 基因用 NCBI 核酸数据库等。对于具体区域的具体类群的 eDNA 监测往往会因为目标数据的有限性使得常用参考数据库中相关序列存储不全所造成的结果遗漏显得不可接受，所以参考数据库的完善对于 eDNA 监测的应用非常必要[40]。在公共参考数据库不能满足特定区域特定类群的研究需求时，可以根据已有材料、已知信息建立本地参考数据库[119-120]。

序列比对注释中另一个需要特别注意的问题是分类置信度的设置。在参考数据库中参考序列对物种覆盖不是十分完全的情况下，如果序列比对注释的分类置信度设置得较低，往往会出现一些错误注释，即把某一物种的序列错误匹配到序列相似的另一物种上，或者把缺少参考序列的某一物种的序列强行匹配到序列相似的另一物种上[40]，在当前参考数据库建设条件下，后一种情况更为普遍。在参考数据库中参考序列对遗传多样性覆盖不是十分完全的情况下，如果序列比对注释的分类置信度设置得很高，往往会出现一些没有注释的 OTU，即该 OTU 序列通过比对无法与参考数据库中的任一序列形成匹配，这种问题在基于不完备的本地数据库的比对注释中较为常见。这是一个参考数据库完备程度和结果匹配精确度之间的适配，可以自行调试合适的参数，比如 97%、99%、99.9%。比对注释所使用的算法差异（比如 BLAST、RDP classifier、Bayesian Lowest Common Ancestor）和软件差异（比如 Qiime2、Usearch）对结果也会产生一定影响，其结

果的准确度需要相应的比较研究来确定，在对不同研究的注释结果进行横向比较时应对算法和软件进行统一。

3.10 监测结果后评估

监测结果后评估主要是对监测结果的样品重复数的后评估、时间有效度的后评估、空间有效度的后评估、注释有效度的后评估，是利用当次监测结果和历史参考数据对当次监测过程中相关环节的评估，其它内容不是不需要评估，而只是因为无法根据当次监测结果进行后评估。样品重复数的后评估，即以当次监测所采样品的检出结果分析样品重复数和目标检出度（或特定目标检出概率）之间的关系，计算当次监测所采样品重复数所能达到的检出度水平，是对样品重复数设计的校验。时间有效度的后评估，即以当次监测相邻采样时间各相应采样点所获得的监测结果差异度（组成差异度或丰度差异度），结合可确认的物种差异或群落结构差异，分析 eDNA 的半衰期，评估当次监测的时间有效度，是对采样时间设计的校验。空间有效度的后评估，即以当次监测各样点所获得的监测结果计算 eDNA 输移或扩散的半衰距离，评估当次监测的空间有效度，是对采样点设计的校验。注释有效度的后评估，即以当次监测所测定序列注释结果与传统调查结果相比较，以及与其它参考数据库注释结果相比较，评估当次监测中参考数据库注释结果的有效度，是对参考数据库及分类学注释的校验。比如在长江武汉江段开展的鱼类 eDNA 监测中，用线粒体 *CO1* 基因宏条形码(引物 mlCOIintF/ jgHCO2198R)共检出 89 种鱼类，其中有 30 种由历史捕捞调查结果所确认，而与之平行开展的捕捞调查监测记录到 35 种鱼类，其中 24 种在 eDNA 监测中被检出[40]。

示例化说明，假如有针对某一小流域的动物多样性监测方案，每个采样点位设计 5 个样品重复，每 2 个月开展 1 次监测，整个样点沿水系及其岸带分布且样点间径流距离 10 km，样品采集以溪流水体和岸带土壤为对象，水样通过抽滤获得富集 eDNA 滤膜，干燥冷冻保存运输，土样直接冷冻保存运输，测序引物选择针对真核生物的 *CO1* 基因通用引物，样品委托商业生物科技公司进行提取、扩增、测序、分析，将已聚类 OTU 序列比对公共参考数据库进行分类学注释，获得目标类群基础生物组成及相对丰度信息。样品重复数的后评估，即对每个采样点位 5 个样品重复的结果进行物种积累曲线分析，估算理论可检出物种数，并根据物种积累曲线模拟获得样品重复数和物种检出度间的量化关系，给出当前监测方案的检出度。时间有效度的后评估，即对每个采样点位的相邻 2 次监测结果进行纵向比较，分析其相似度（重复度）及其变化规律，获得其动物活动时间差异性和 eDNA 半衰期，给出当前监测方案的时间有效度。空间有效度的后评估，即对系列采样点每次的监测结果进行横向比较，分析在每次采样时段样点间 eDNA 输移的半衰距离，给出当前监测方案的空间有效度。注释有效度的后评估，即将分类学注释结果（或结果中某特定类群）与传统分类学调查结果进行对比，评估注释结果的有效度（正确注释的比例、注释结果对传统分类学调查结果的覆盖度等）。

监测结果后评估，不是一个困难的工作，也不需要另外投入物力去补充实验，只需要根据已获得结果对相关问题进行后验的分析评估即可。当前的研究绝大多数没有开展监测结果后评估，只是因为没有注意到这个内容的必要性。希望这个内容在之后的 eDNA 监测分析评估工作中能够得到践行。

4 eDNA 监测技术应用图景

4.1 未来的 eDNA 监测应用场景

随着生态文明建设的推进，更为系统化精细化的生物监测评估将是未来生态环境适应性管理的基础需求，eDNA 监测在未来可凭借其检出率高、所需样品重复数少、所需付出的人力物力时间成本低[121-122]的优势作为传统监测方案的便捷高效的补充方案。比如在加拿大魁北克地区对 3 种两栖类开展的监测中，用传统主动搜索方法观察到目标物种的溪流中都监测到了相应的 eDNA 信号，主动搜索没有观察到目标物种的 9 条溪流中也监测到了相关 eDNA 信号[121]。在美国新泽西州 12 个葡萄园的 48 个地块内开展的入侵生物监测中，eDNA 监测的检出率比传统目视查找的检出率高一倍多，要达到 95%的检出度，仅需要开展 5 个次葡萄园和 12 个次地块 eDNA 监测,但对应的需要开展 14 个次葡萄园和 29 个次地块独立目视监测[122]。因此，eDNA 监测完全可以作为一个补充方案或者延伸方案来应用，以发现那些难以被记录到或者容易被忽略的生物信息。

随着开放科学的推进，更为标准化系列化的生物监测结果将是未来生态环境基础数据透明开放共享的基础需求，对长期定期监测区域或对象的技术标准化 eDNA 监测作为常规生物监测工具之一，其所获得的标准化系列化监测记录和数据可以为研究者、产业界和政府部门的研究和决策提供通用的科学数据基础(表 3)。研究者、产业界和政府部门可以把 eDNA 监测纳入其生物监测工具包中，按标准化设计的样点和频度进行长期性周期性监测，生成标准化技术文本和结果文件，形成相关数据的标准化系列化积累，并通过推进数据的通用、集成、开放获取为后续的大尺度、长序列研究及相关决策提供具有重要意义的数据包[123-124]。比如水生动物共生微生物影响着宿主的健康[124-126]，同时又受环境微生物的显著影响[29,127-130]，因而对环境微生物进行 eDNA 监测，不仅可用以评估水体微生态健康状况，也可用以预警水生动物健康状况[29,124]，进而为水生态系统管理提供支持，为水生野生动物保护提供支撑。长序列的 eDNA 监测结果文件，也可以为全球变化的生态系统响应、生态环境保护的生态恢复效果等的深入研究提供数据源支撑，并为后续的管理决策和应对政策提供科学支持。

表 3 未来的 eDNA 监测应用场景概述*

Tab.3 Summary of the scopes of the eDNA monitoring in future

eDNA 监测一级应用场景		二级应用场景
生态系统类型	淡水生态系统、海洋生态系统、草地生态系统、森林生态系统、城市生态系统、农田生态系统、共生生态系统、古生态系统、流域生态系统等	生态学研究（借助新技术和大数据开展经典生态学问题研究、大尺度生态学问题研究、复杂性生态学问题研究等）
监测介质类型	水体、沉积物、土壤、组织混合物、器物生物（内）表面附着物、痕迹等	生物多样性保护（物种人工保育、就地保护、保护地建设与管理等）
监测目标群体	哺乳类、鸟类、两栖爬行类、鱼类、陆生节肢软体类、水生底栖生物、浮游动物、浮游植物、维管束植物、真菌、细菌、古菌等类群	生态系统管理（种群重建、群落调控、生境修复、生态重建、生态系统结构优化等）
监测目的/需求	开展迁徙洄游种监测、珍稀濒危种监测、外来种入侵种监测、隐形种监测检出、生物多样性调查评估、生态系统结构动态监	生态安全（检验检疫、外来种监控等）、生态政治和气候变化政治（自主贡献份

测、生态系统过程监测分析、生态系统功能分析和健康评价等	额计算、政策措施制定和效果评估等）

* 因为 eDNA 监测的本质在于生物信息的检出，所以 eDNA 监测的一级应用场景即在各种生态系统中以各种介质以各生物类群为目标群体开展相应监测分析评估，故在此对其进行矩阵化概述；因为 eDNA 监测结果的数据包/集（规范、透明、开放获取）可以为非常多研究、管理提供基础数据，所以基于 eDNA 监测结果数据包/集的二级应用场景丰富到无法有效具体罗列，故只做大类概述，不做具体枚举。

4.2 未来的 eDNA 监测技术状况

未来 5~10 年或将是 eDNA 监测技术标准化急速发展的时期，到 2030 年前后，预期将基本完成采样方案、样品处理方法、分子实验方案、监测结果后评估方法的标准化。届时，热点区域特定研究对象 eDNA 监测的样品重复数检出度、eDNA 的降解时间周期、eDNA 空间输移的有效距离、eDNA 赋存形态和效率等 eDNA 生态学过程的关键参数将完成相应积累，eDNA 监测方案中的样品重复数设置、时间设置、空间设置、样品介质选择或组合将形成一套比较确定的参数，指导和支撑相关长期定期监测，进而为相关研究提供开放、稳定的系列化数据源。非热点区域的 eDNA 监测方案中的样品重复数设置、时间设置、空间设置、样品介质选择或组合也可以通过本框架所示的采样方案制定方法而进行确定。

样品处理（样品前处理、样品保存方法）也将通过对各种方法和处理效果的对比，选定可以满足要求的一整套优化处理方法。当前国外[54-55]和国内[2]已经有相关的标准制定，虽然离完全达成共识成为通用执行标准还有一段距离，但可以预见，在有组织地推动下，有望在领域内达成共识并形成统一规范。分子实验将更多地实现引物选择趋同，室内实验由商业生物科技公司来完成，数据分析依托商业生物科技公司所提供的分析软件分析平台来完成。当前 eDNA 监测的引物选择已形成部分共识；室内实验大多由商业生物科技公司来完成，而商业生物科技公司所采用的程序基本一致，只是个别细节参数可能需要进一步统一；基础生物信息分析软件的开源获取和广泛使用已实现了数据分析基础构架的初步标准化，只是在结果的展示上需要达成统一，即在结果的展示中哪些结果必须提供。

监测结果后评估（包括对样品重复数、样点空间布设、采样时间设定、注释有效度等的评估）也将随着研究者们逐渐意识到其必要性和重要性，而获得方法标准化上的共识，并随着相关通用计算方法、计算代码、计算程序的发布而得以实现。已有组织提出对研究团队 eDNA 监测能力进行评估，以适应未来常态化监测[131]，当前的标准化整体框架或可为研究团队 eDNA 监测能力建设提供指引。

更进一步来讲，随着社会需求扩张和科学技术发展之间的循环联动，eDNA 监测必然向更快速、便捷、全面、准确、智能、便宜、透明、可得等方向发展，由于 eDNA 的生态学特性，样品重复数、样点空间布设、采样时间设定等所依赖的科学基础不会发生明显改变，所以 eDNA 监测未来进一步发展的压力基本在技术进步和管理进步上。技术进步，主要是针对固定监测站点的在线自动化实时监测实时分析实时上报、针对非固定站点的流动便携监测设备的一体化采样分析和数据结果上传以及监测结果的提质和监测成本的压缩。管理进步，主要是多部门多数据源（比如水文数据、水环境数据、气象数据、人类活动数据、生物数据等）的实时集总实时关联分析实时预警，以及周期性数据包的发布等。

[2] http://www.chinacses.org/xw/gsgg/202205/t20220516_982140.shtml.

4.3 eDNA 监测技术亟需解决的几个参数和问题

就当前的 eDNA 监测技术应用来看，有几个技术参数和问题亟需解决，因为这几个技术参数和问题在理论上并不存在困难，只是需要一批相对细致的实验研究来进行数据积累，所以比较容易解决。1）eDNA 监测需要设置的样品重复数，即需要尽快积累各个监测区域/监测点不同环境条件下的样品重复数—检出度曲线，给出合适的检出度目标下所需的样品重复数。2）eDNA 监测两次采样间的时间间隔，即尽快积累各个监测区域各个季节各个目标生物类群的 eDNA 半衰时间，给出合适的监测辨别度目标下最小的时间间隔。3）eDNA 监测样点的间距设置，即需要对于静水水体和陆地（以及其它无明确 eDNA 输移的对象），尽快积累各监测区域监测点不同环境条件下的样点—物种差异度曲线，对于流水水体（以及其它存在明确 eDNA 输移的对象，比如气溶胶和碎屑浮尘），尽快积累各监测河段监测点不同环境条件下的 eDNA 随径流（气流）输移的半衰距离，给出合适的监测精度目标下所需的样点间距。4）eDNA 监测的扩增引物和参考数据库，即尽快完善各个类群的公共参考数据库建设，在公共参考数据库短时间内无法完成的情况下，尽快建立各自的本地参考数据库，并针对各特定目标类群和参考数据库确定合适的 OTU 聚类序列相似度值和序列比对注释分类置信度。5）eDNA 监测结果的定量模型，因为有各种因素引起结果系统性偏移，所以在完全弄清楚各个影响因素和影响过程之前，针对生物类群的 eDNA 监测，尽快积累各个类群实际群落结构和 eDNA 监测结果的拟合关系，建立通过 eDNA 监测结果获得实际群落结构信息的映射模型；针对具体目标物种的 eDNA 监测，尽快积累种群资源数量/重量和 eDNA 监测检出概率的量化关系，建立通过 eDNA 监测检出概率反推种群资源数量/重量信息的映射模型。

4.4 eDNA 监测技术标准化系统性整体框架的说明

考虑到无法对多种多样的 eDNA 监测相关工作给出一个确切的标准化方案，也无意对每种 eDNA 监测工作分别给出一个确切的标准化方案，所以本文未对具体的标准化参数进行综述和论证，只集中于 eDNA 监测技术标准化系统性整体框架的构建和说明。本文所提出的 eDNA 监测技术标准化系统性整体框架（图 1，表 4）旨在为 eDNA 监测技术标准化参与者及 eDNA 监测技术常态化应用者提供一个用于设计、完善、评估 eDNA 监测的稳健框架，以促进 eDNA 监测在特定物种预警监测、特定类群生物多样性监测评估、生态系统健康监测评价等工作中的常规应用，从而获得先前所难以获得的对特定物种及早检出、对生态环境状况深入理解。期待本系统性整体框架能成为一种便利的指引，参与者、使用者通过参与、应用、反馈、修订不断加强和改进 eDNA 监测技术的有效性、适应性。

表 4 eDNA 监测技术标准化系统性整体框架的适用概述*

Tab.4 Summary of the eDNA monitoring standardizing framework suitability in different sample types

eDNA 监测技术标准化系统性整体框架中的 10 大环节	**适用对象**					
	流水水体	**静水水体**	**沉积物、土壤**	**气溶胶、碎屑浮尘**	**物体、生物的(内)表面**	**备注**
样品重复数设计标准化	通过物种积累曲线分析计算样品重复数—目标检出度的量化关系	通过物种积累曲线分析计算样品重复数—目标检出度的量化关系	通过物种积累曲线分析计算样品重复数—目标检出度的量化关系	通过物种积累曲线分析计算样品重复数—目标检出度的量化关系	通过物种积累曲线分析计算样品重复数—目标检出度的量化关系	针对特定单物种的样品重复数设计依赖于目标物种的检出概率计算
采样时间设计标准化	定量研究目标群体 eDNA 持留时间	定量研究目标群体 eDNA 降解速率	定量研究目标群体 eDNA 持留时间或降解速率	定量研究目标群体 eDNA 持留时间或降解速率	定量研究目标群体 eDNA 降解速率	存在 eDNA 输移的情况时，即需考虑持留时间
采样点设计标准化	定量研究 eDNA 有效输移距离	预估目标类群空间分布、定量研究 eDNA 有效扩散距离	预估目标类群空间分布、定量研究 eDNA 有效扩散距离	定量研究 eDNA 有效输移/扩散距离	预估目标类群空间分布	存在明确 eDNA 输移则量化有效输移距离;不存在明确 eDNA 输移则量化种—面积（样品数）关系
采样方法设计标准化	根据目标 eDNA 分布保存的特异性来选择，注意分水层取样	根据目标 eDNA 分布保存的特异性来选择，注意分水层取样	根据目标 eDNA 分布保存的特异性来选择	根据目标 eDNA 分布保存的特异性来选择	根据目标 eDNA 分布保存的特异性来选择	不同样品类型有其检出对象差异性；同一样点不同重复不进行混样
样品前处理方法标准化	用微孔滤膜抽滤富集 eDNA	用微孔滤膜抽滤富集 eDNA	直接采样密封冷冻	用微孔滤膜抽滤富集 eDNA，或直接采样密封冷冻	直接采样密封冷冻	水样不建议预先抽滤，除了针对特定类群 eDNA 富集而开展的筛选
样品保存方法标准化	水样冰点转运，滤膜样品干燥冷冻保存运输	水样冰点转运，滤膜样品干燥冷冻保存运输	冷冻保存运输	滤膜样品和碎屑浮尘样品冷冻保存运输	冷冻保存运输	-80℃保存、-20℃运输

杨海乐,张辉,杜浩.eDNA监测方法标准化框架及未来图景.湖泊科学,2023,35(1):12-31.DOI:10.18307/2023.0100.

扩增引物选择标准化	物种特异性引物、metabarcoding 通用引物	物种特异性引物、metabarcoding 通用引物	物种特异性引物、metabarcoding 通用引物	物种特异性引物、metabarcoding 通用引物	物种特异性引物、metabarcoding 通用引物	根据目标，选择物种特异性引物或 metabarcoding 通用引物
样品提取—扩增—测序—分析程序标准化	依操作规程进行、委托商业生物科技公司提供技术服务	依操作规程进行、委托商业生物科技公司提供技术服务	依操作规程进行、委托商业生物科技公司提供技术服务	依操作规程进行、委托商业生物科技公司提供技术服务	依操作规程进行、委托商业生物科技公司提供技术服务	对相关技术参数及其影响需要有一定理解
序列比对注释标准化	比对公共参考数据库、本地参考数据库	比对公共参考数据库、本地参考数据库	比对公共参考数据库、本地参考数据库	比对公共参考数据库、本地参考数据库	比对公共参考数据库、本地参考数据库	关注分类置信度的设置，继续完善（公共的和本地的）参考数据库
监测结果后评估标准化	样品重复数、时间间隔、空间距离、注释效率的后评估	样品重复数、时间间隔、空间距离、注释效率的后评估	样品重复数、时间间隔、空间距离、注释效率的后评估	样品重复数、时间间隔、空间距离、注释效率的后评估	样品重复数、时间间隔、注释效率的后评估	监测结果后评估是对监测方案设计有效性的度量

* 基于针对特定物种探针引物的 eDNA 监测，不需要测序分析和序列比对注释，甚至不需要从样品保存到序列比对注释的 4 个环节内容。

5 总结与展望

目前，eDNA 监测技术标准化 10 个环节中的部分技术标准化问题已在一定程度上得以解决，剩下的问题在具体的目标指引下，也有望在短期内获得一定程度的解决。在当前技术快速进步知识快速积累的时代，只要是通过技术进步和知识积累能够解决的问题，就一定能够解决，技术路径就一定能够走通。期待未来 5~10 年内，eDNA 监测在一些热点区域（比如长江）成为一个长期性周期性的常规监测内容，并建立严谨、透明、开放、可用的高质量 eDNA 监测系列数据集，推动生物多样性(及隐藏生物多样性(hidden biodiversity))研究的开放参与[132]，为第四范式的（生态学）科学研究提供数据驱动支撑[133]，为生态系统功能及健康管理的系统设计和快速反应提供深度理解和及时预警。

6 参考文献

[1] Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M *et al*. Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 2012, **21**(8): 1789-1793. DOI: 10.1111/j.1365-294x.2012.05542.x.

[2] Pawlowski J, Apothéloz-Perret-Gentil L, Altermatt F. Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology*, 2020, **29**(22): 4258-4264. DOI: 10.1111/mec.15643.

[3] Ogram A, Sayler GS, Barkay T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 1987, **7**(2/3): 57-66. DOI: 10.1016/0167-7012(87)90025-X.

[4] Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F *et al*. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 2008, **4**(4): 423-425. DOI: 10.1098/rsbl.2008.0118.

[5] Shokralla S, Spall JL, Gibson JF *et al*. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, 2012, **21**(8): 1794-1805. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x.

[6] Ren Z, Wang F, Qu XD *et al*. Taxonomic and functional differences between microbial communities in Qinghai Lake and its input streams. *Frontiers in Microbiology*, 2017, **8**: 2319. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02319.

[7] Gusareva ES, Acerbi E, Lau KJX *et al*. Microbial communities in the tropical air ecosystem follow a precise diel cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, **116**(46): 23299-23308. DOI: 10.1073/pnas.1908493116.

[8] Landesman WJ, Freedman ZB, Nelson DM. Seasonal, sub-seasonal and diurnal variation of soil bacterial community composition in a temperate deciduous forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 2019, **95**(2): fiz002. DOI: 10.1093/femsec/fiz002.

[9] Yang H, Du H, Qi H *et al*. Watershed biological information flow driven by natural runoff in Shaliu River Basin on Qinghai-Tibet Plateau indicated by environmental microbes. *Acta Ecologica Sinica*, 2021, **41**(9): 3475-3487. [杨海乐, 杜浩, 祁洪芳等. 青藏高原沙柳河流域自然径流驱动的流域生物信息流量化特征——以环境微生物为指标. 生态学报, 2021, **41**(9): 3475-3487.]

[10] Bálint M, Pfenninger M, Grossart HP *et al*. Environmental DNA time series in ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 2018, **33**(12): 945-957. DOI: 10.1016/j.tree.2018.09.003.

[11] Korosi JB, Thienpont JR, Smol JP *et al*. Paleo-ecotoxicology: What can lake sediments tell us about ecosystem responses to environmental pollutants?. *Environmental Science & Technology*, 2017, **51**(17): 9446-9457. DOI: 10.1021/acs.est.7b02375.

[12] Thomsen PF, Willerslev E. Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 2015, **183**: 4-18. DOI: 10.1016/j.biocon.2014.11.019.

[13] Larson ER, Graham BM, Achury R *et al*. From eDNA to citizen science: emerging tools for the early detection of invasive species. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2020, **18**(4): 194-202. 10.1002/fee.2162.

[14] Sengupta ME, Hellström M, Kariuki HC *et al*. Environmental DNA for improved detection and environmental surveillance of schistosomiasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, **116**(18): 8931-8940. DOI: 10.1073/pnas.1815046116.

[15] Boussarie G, Bakker J, Wangensteen OS *et al*. Environmental DNA illuminates the dark diversity of sharks. *Science Advances*, 2018, **4**(5): eaap9661. DOI: 10.1126/sciadv.aap9661.

[16] Coble AA, Flinders CA, Homyack JA *et al*. eDNA as a tool for identifying freshwater species in sustainable forestry: A critical review and potential future applications. *Science of the Total Environment*, 2019, **649**: 1157-1170. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.370.

[17] Deiner K, Bik HM, Mächler E *et al*. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 2017, **26**(21): 5872-5895. DOI: 10.1111/mec.14350.

[18] Sales NG, McKenzie MB, Drake J *et al*. Fishing for mammals: Landscape-level monitoring of terrestrial and semi-aquatic communities using eDNA from riverine systems. *Journal of Applied Ecology*, 2020, **57**(4): 707-716. DOI: 10.1111/1365-2664.13592.

[19] Carraro L, Hartikainen H, Jokela J *et al*. Estimating species distribution and abundance in river networks using environmental DNA. *PNAS*, 2018, **115**(46): 11724-11729. DOI: 10.1073/pnas.1813843115.

[20] Seymour M. Rapid progression and future of environmental DNA research. *Communications Biology*, 2019, **2**: 80. DOI: 10.1038/s42003-019-0330-9.

[21] Veilleux HD, Misutka MD, Glover CN. Environmental DNA and environmental RNA: Current and prospective applications for biological monitoring. *Science of the Total Environment*, 2021, **782**: 146891. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146891.

[22] Yang HL, Du H, Qi HF *et al*. Effectiveness assessment of using riverine water eDNA to simultaneously monitor the riverine and riparian biodiversity information, *Scientific Reports*, 2021, **11**(1): 1-11. DOI: 10.1038/s41598-021-03733-7.

[23] Lynggaard C, Bertelsen MF, Jensen CV *et al*. Airborne environmental DNA for terrestrial vertebrate community monitoring. *Current Biology*, 2022, **32**(3): 701-707.e5. DOI: 10.1016/j.cub.2021.12.014.

[24] Clare EL, Economou CK, Bennett FJ *et al*. Measuring biodiversity from DNA in the air. *Current Biology*, 2022, **32**(3): 693-700.e5. DOI: 10.1016/j.cub.2021.11.064.

[25] Shao XN, Song DZ, Huang QW *et al*. Fast surveys and molecular diet analysis of carnivores based on fecal DNA and metabarcoding. *Biodiversity Science*, 2019, **27**(5): 543-556. DOI: 10.17520/biods.2018214. [邵昕宁, 宋大昭, 黄巧雯等. 基于粪便DNA及宏条形码技术的食肉动物快速调查及食性分析. 生物多样性, 2019, **27**(5): 543-556.]

[26] Schattanek P, Riccabona SA, Rennstam Rubbmark O *et al*. Detection of prey DNA in bat feces: Effects of time since feeding, meal size, and prey identity. *Environmental DNA*, 2021, **3**(5): 959-969. DOI: 10.1002/edn3.205.

[27] Reinhart EM, Korry BJ, Rowan-Nash AD *et al*. Defining the distinct skin and gut microbiomes of the northern Pike (*Esox lucius*). *Frontiers in Microbiology*, 2019, **10**: 2118. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02118.

[28] Guivier E, Pech N, Chappaz R *et al*. *Microbiota* associated with the skin, gills, and gut of the fish *Parachondrostoma toxostoma* from the Rhône Basin. *Freshwater Biology*, 2020, **65**(3): 446-459. DOI: 10.1111/fwb.13437.

[29] Yang HL, Wu JM, Du H *et al*. Quantifying the colonization of environmental microbes in the fish gut: A case study of wild fish populations in the Yangtze River. *Frontiers in Microbiology*, 2022, **12**: 828409. DOI: 10.3389/fmicb.2021.828409.

[30] Tong Q, Hu ZF, Du XP *et al*. Effects of seasonal hibernation on the similarities between the skin *Microbiota* and gut *Microbiota* of an amphibian (*Rana dybowskii*). *Microbial Ecology*, 2020, **79**(4): 898-909. DOI: 10.1007/s00248-019-01466-9.

[31] Hu YX, Peng Y, Li RW *et al*. Plankton diversity and community characteristics in Danjiangkou Reservoir based on environmental DNA metabarcoding. *J Lake Sci*, 2021, **33**(6): 1650-1659. DOI: 10.18307/2021.0604. [胡愈炘, 彭玉, 李瑞雯等. 基于环境DNA宏条形码的丹江口水库浮游生物多样性及群落特征. 湖泊科学, 2021, **33**(6): 1650-1659.]

[32] Sun J, Yang J, Zhang X. Identification and biomass monitoring of zooplankton Cladocera species with eDNA metabarcoding technology. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2018, **13**(5): 76-86. DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20180108001. [孙晶莹, 杨江华, 张效伟. 环境DNA(eDNA)宏条形码技术对枝角类浮游动物物种鉴定及其生物量监测研究. 生态毒理学报, 2018, **13**(5): 76-86.]

[33] Matsuoka S, Sugiyama Y, Sato H *et al*. Spatial structure of fungal DNA assemblages revealed with eDNA metabarcoding in a forest river network in western Japan. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2019, **3**: e36335. DOI: 10.3897/mbmg.3.36335.

[34] Heeger F, Wurzbacher C, Bourne EC *et al*. Combining the 5.8S and ITS2 to improve classification of fungi. *Methods in Ecology and Evolution*, 2019, **10**(10): 1702-1711. DOI: 10.1111/2041-210x.13266.

[35] Coghlan SA, Shafer ABA, Freeland JR. Development of an environmental DNA metabarcoding assay for aquatic vascular plant communities. *Environmental DNA*, 2021, **3**(2): 372-387. DOI: 10.1002/edn3.120.

[36] Stoeckle BC, Kuehn R, Geist J. Environmental DNA as a monitoring tool for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.): A substitute for classical monitoring approaches?. *Aquatic Conservation*: *Marine and Freshwater Ecosystems*, 2016, **26**(6): 1120-1129. DOI: 10.1002/aqc.2611.

[37] Sansom BJ, Sassoubre LM. Environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates to model freshwater mussel eDNA transport in a river. *Environmental Science & Technology*, 2017, **51**(24): 14244-14253. DOI: 10.1021/acs.est.7b05199.

[38] Carraro L, Mächler E, Wüthrich R *et al*. Environmental DNA allows upscaling spatial patterns of biodiversity in freshwater ecosystems. *Nature Communications*, 2020, **11**: 3585. DOI: 10.1038/s41467-020-17337-8.

[39] Afzali SF, Bourdages H, Laporte M *et al*. Comparing environmental metabarcoding and trawling survey of demersal fish communities in the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Environmental DNA*, 2021, **3**(1): 22-42. 10.1002/edn3.111.

[40] Yang H, Wu J, Zhang H *et al*. Environmental DNA metabarcoding utilization efficiency in monitoring large river fish species composition: a case study in the Wuhan transect of the Yangtze River. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, **28**(6): 796-807. DOI: 10.12264/JFSC2021-0556. [杨海乐，吴金明，张辉等. 大型河流中鱼类组成的eDNA监测效率：以长江武汉江段为例. 中国水产科学, 2021, **28**(6): 796-807.]

[41] Valentini A, Taberlet P, Miaud C *et al*. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 2016, **25**(4): 929-942. DOI: 10.1111/mec.13428.

[42] Evans NT, Olds BP, Renshaw MA *et al*. Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 2016, **16**(1): 29-41. DOI: 10.1111/1755-0998.12433.

[43] Ji YQ, Ashton L, Pedley SM *et al*. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology Letters*, 2013, **16**(10): 1245-1257. DOI: 10.1111/ele.12162.

[44] Bohmann K, Evans A, Gilbert MTP *et al*. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, 2014, **29**(6): 358-367. DOI: 10.1016/j.tree.2014.04.003.

[45] Zhang MZ, Sun QY, Chen PX *et al*. How microorganisms tell the truth of potentially toxic elements pollution in environment. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, **431**: 128456. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.128456.

[46] Bass D, Stentiford GD, Littlewood DTJ *et al*. Diverse applications of environmental DNA methods in parasitology. *Trends in Parasitology*, 2015, **31**(10): 499-513. DOI: 10.1016/j.pt.2015.06.013.

[47] Deiner K, Fronhofer EA, Mächler E *et al*. Environmental DNA reveals that rivers are conveyer belts of biodiversity information. *Nature Communications*, 2016, **7**: 12544. DOI: 10.1038/ncomms12544.

[48] Cristescu ME, Hebert PDN. Uses and misuses of environmental DNA in biodiversity science and conservation. *Annual Review of Ecology*, *Evolution*, *and Systematics*, 2018, **49**: 209-230. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-110617-062306.

[49] Beng KC, Corlett RT. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: Opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and Conservation*, 2020, **29**(7): 2089-2121. DOI: 10.1007/s10531-020-01980-0.

[50] Darling JA, Pochon X, Abbott CL *et al*. The risks of using molecular biodiversity data for incidental detection of species of concern. *Diversity & Distributions*, 2020, **26**(9): 1116-1121. DOI: 10.1111/ddi.13108.

[51] Loeza-Quintana T, Abbott CL, Heath DD *et al*. Pathway to Increase Standards and Competency of eDNA Surveys (PISCeS)—Advancing collaboration and standardization efforts in the field of eDNA. *Environmental DNA*, 2020, **2**(3): 255-260. DOI: 10.1002/edn3.112.

[52] Nicholson A, McIsaac D, MacDonald C *et al*. An analysis of metadata reporting in freshwater environmental DNA research calls for the development of best practice guidelines. *Environmental DNA*, 2020, **2**(3): 343-349. DOI: 10.1002/edn3.81.

[53] Dickie IA, Boyer S, Buckley HL *et al*. Towards robust and repeatable sampling methods in eDNA-based studies. *Molecular Ecology*

Resources, 2018, **18**(5): 940-952. 10.1111/1755-0998.12907

[54] Minamoto T, Miya M, Sado T *et al*. An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols. *Environmental DNA*, 2021, **3**(1): 8-13. DOI: 10.1002/edn3.121.

[55] Leese F, Bouchez A, Abarenkov K *et al*. Why we need sustainable networks bridging countries, disciplines, cultures and generations for aquatic biomonitoring 2.0: A perspective derived from the DNAqua-net COST action. *Advances in Ecological Research*, 2018, **58**: 63-99. DOI: 10.1016/bs.aecr.2018.01.001.

[56] Harper LR, Lawson Handley L, Carpenter AI *et al*. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding of pond water as a tool to survey conservation and management priority mammals. *Biological Conservation*, 2019, **238**: 108225. DOI: 10.1016/j.biocon.2019.108225.

[57] Ling J, Jiang Y, Sun P *et al.* Application and evaluation of enviro nmental DNA technology in fish diversity research in Xiangshan Bay. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, **28**(2): 205-214. DOI: 10.12264/JFSC2020-0219. [凌建忠, 姜亚洲, 孙鹏等. 环境DNA技术在象山港水域鱼类多样性调查中的应用与评估. 中国水产科学, 2021, **28**(2): 205-214.]

[58] Chen JQ, Dong L, Ma XM *et al*. Microbial community monitoring in Baiyangdian Lake based on eDNA technology. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, **40**(8): 1773-1786, 1839. [陈家琪, 董丽, 麻晓梅等. 基于eDNA技术的白洋淀微型生物群落监测. 农业环境科学学报, 2021, **40**(8): 1773-1786, 1839.]

[59] Li S, Liu X, Jiang W *et al.* Application of environmental DNA technology in natural reproduction of the four major Chinese carps in Yichang section of Yangtze River, China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2021, **32**(6): 2241-2248. DOI: 10.13287/j.1001-9332.202106.037. [李莎, 刘雪清, 姜伟等. 环境DNA技术在宜昌江段四大家鱼自然繁殖中的应用. 应用生态学报, 2021, **32**(6): 2241-2248.]

[60]Li M, Shan X, Wang W *et al*. Studying the retention time of *Fenneropenaeus chinensis* eDNA in water. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, **41**(1): 51-57. DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180906005. [李苗, 单秀娟, 王伟继等. 环境DNA在水体中存留时间的检测研究——以中国对虾为例. 渔业科学进展, 2020, **41**(1): 51-57.]

[61] Stat M, Huggett MJ, Bernasconi R *et al*. Ecosystem biomonitoring with eDNA: Metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment.*Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 1-11. DOI: 10.1038/s41598-017-12501-5.

[62] Li HX, Huang XN, Li SG *et al*. Environmental DNA (eDNA)-metabarcoding-based early monitoring and warning for invasive species in aquatic ecosystems. *Biodiversity Science*, 2019, **27**(5): 491-504. DOI: 10.17520/biods.2018233. [李晗溪, 黄雪娜, 李世国等. 基于环境DNA-宏条形码技术的水生生态系统入侵生物的早期监测与预警. 生物多样性, 2019, **27**(5): 491-504.]

[63] Li M, Wei TT, Shi BY *et al*. Biodiversity monitoring of freshwater benthic macroinvertebrates using environmental DNA. *Biodiversity Science*, 2019, **27**(5): 480-490. DOI: 10.17520/biods.2018227. [李萌, 尉婷婷, 史博洋等. 环境DNA技术在淡水底栖大型无脊椎动物多样性监测中的应用. 生物多样性, 2019, **27**(5): 480-490.]

[64] Jo T, Arimoto M, Murakami H *et al*. Particle size distribution of environmental DNA from the nuclei of marine fish. *Environmental Science & Technology*, 2019, **53**(16): 9947-9956. DOI: 10.1021/acs.est.9b02833.

[65] Wei N, Nakajima F, Tobino T. A microcosm study of surface sediment environmental DNA: Decay observation, abundance estimation, and fragment length comparison. *Environmental Science & Technology*, 2018, **52**(21): 12428-12435. DOI: 10.1021/acs.est.8b04956.

[66] Klymus KE, Merkes CM, Allison MJ *et al*. Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA*, 2020, **2**(3): 271-282. DOI: 10.1002/edn3.29.

[67] Andruszkiewicz Allan E, Zhang WG, Lavery A *et al*. Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes. *Environmental DNA*, 2021, **3**(2): 492-514. DOI: 10.1002/edn3.141.

[68] Bochove K, Bakker FT, Beentjes KK *et al*. Organic matter reduces the amount of detectable environmental DNA in freshwater. *Ecology and Evolution*, 2020, **10**(8): 3647-3654. DOI: 10.1002/ece3.6123.

[69] Barnes MA, Turner CR, Jerde CL *et al*. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science & Technology*, 2014, **48**(3): 1819-1827. DOI: 10.1021/es404734p.

[70] Eichmiller JJ, Best SE, Sorensen PW. Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water.

Environmental Science & Technology, 2016, **50**(4): 1859-1867. DOI: 10.1021/acs.est.5b05672.

[71] Jo T, Arimoto M, Murakami H *et al*. Estimating shedding and decay rates of environmental nuclear DNA with relation to water temperature and biomass. *Environmental DNA*, 2020, **2**(2): 140-151. DOI: 10.1002/edn3.51.

[72] Strickler KM, Fremier AK, Goldberg CS. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 2015, **183**: 85-92. DOI: 10.1016/j.biocon.2014.11.038.

[73] Turner CR, Uy KL, Everhart RC. Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation*, 2015, **183**: 93-102. DOI: 10.1016/j.biocon.2014.11.017.

[74] Seymour M, Durance I, Cosby BJ *et al*. Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Communications Biology*, 2018, **1**: 4. DOI: 10.1038/s42003-017-0005-3.

[75] Zhang N, Chou B, Xie Y *et al*. Research progress of environmental DNA shedding, decay and transport in aquatic ecosystem. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2021, **43**(3): 129-135. [张娜，仇保丰，谢艳辉等. 水环境生态系统中环境DNA脱落、衰变和运输过程的研究进展. 海洋湖沼通报, 2021, **43**(3): 129-135.]

[76] Gordon M, van Norman K. Mycelial DNA persistence in a forest soil. *Environmental DNA*, 2021, **3**(6): 1208-1213. DOI: 10.1002/edn3.242.

[77] Saito T, Doi H. Degradation modeling of water environmental DNA: Experiments on multiple DNA sources in pond and seawater. *Environmental DNA*, 2021, **3**(4): 850-860. DOI: 10.1002/edn3.192.

[78] Jo T, Murakami H, Masuda R *et al*. Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 2017, **17**(6): e25-e33. DOI: 10.1111/1755-0998.12685.

[79] Barnes MA, Turner CR. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 2016, **17**(1): 1-17. DOI: 10.1007/s10592-015-0775-4.

[80] Jerde CL, Olds BP, Shogren AJ *et al*. Influence of stream bottom substrate on retention and transport of vertebrate environmental DNA. *Environmental Science & Technology*, 2016, **50**(16): 8770-8779. DOI: 10.1021/acs.est.6b01761.

[81] Shogren AJ, Tank JL, Andruszkiewicz E *et al*. Controls on eDNA movement in streams: Transport, retention, and resuspension. *Scientific Reports*, 2017, **7**: 5065. DOI: 10.1038/s41598-017-05223-1.

[82] Fremier AK, Strickler KM, Parzych J *et al*. Stream transport and retention of environmental DNA pulse releases in relation to hydrogeomorphic scaling factors. *Environmental Science & Technology*, 2019, **53**(12): 6640-6649. DOI: 10.1021/acs.est.8b06829.

[83] Pont D, Rocle M, Valentini A *et al*. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Scientific Reports*, 2018, **8**: 10361. DOI: 10.1038/s41598-018-28424-8.

[84] Carraro L, Stauffer JB, Altermatt F. How to design optimal eDNA sampling strategies for biomonitoring in river networks. *Environmental DNA*, 2021, **3**(1): 157-172. DOI: 10.1002/edn3.137.

[85] Thalinger B, Kirschner D, Pütz Y *et al*. Lateral and longitudinal fish environmental DNA distribution in dynamic riverine habitats. *Environmental DNA*, 2021, **3**(1): 305-318. DOI: 10.1002/edn3.171.

[86] Laporte M, Bougas B, Côté G *et al*. Caged fish experiment and hydrodynamic bidimensional modeling highlight the importance to consider 2D dispersion in fluvial environmental DNA studies. *Environmental DNA*, 2020, **2**(3): 362-372. DOI: 10.1002/edn3.88.

[87] Yang H, Zhang H, Wu J *et al*. Simulating the impacts of parallel samples on the estimations of upstream-to-downstream watershed biological information flow. *Acta Ecologica Sinica*, 2022, **42**(13). DOI: 10.5846/stxb202104271109. [杨海乐，张辉，吴金明等. 平行样对自上游到下游的流域生物信息流估算的影响: 来自模拟计算的结果. 生态学报, 2022, **42**(13).]

[88] Zhang S, Lu Q, Wang YY *et al*. Assessment of fish communities using environmental DNA: Effect of spatial sampling design in lentic systems of different sizes. *Molecular Ecology Resources*, 2020, **20**(1): 242-255. DOI: 10.1111/1755-0998.13105.

[89] Jeunen GJ, Lamare MD, Knapp M *et al*. Water stratification in the marine biome restricts vertical environmental DNA (eDNA) signal dispersal. *Environmental DNA*, 2020, **2**(1): 99-111. DOI: 10.1002/edn3.49.

[90] Koziol A, Stat M, Simpson T *et al*. Environmental DNA metabarcoding studies are critically affected by substrate selection. *Molecular Ecology Resources*, 2019, **19**(2): 366-376. DOI: 10.1111/1755-0998.12971.

[91] van der Heyde M, Bunce M, Wardell-Johnson G *et al*. Testing multiple substrates for terrestrial biodiversity monitoring using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 2020, **20**(3): 10.1111/1755-10.1111/0998.13148. DOI: 10.1111/1755-0998.13148.

[92] Sakata MK, Yamamoto S, Gotoh RO *et al*. Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA. *Environmental DNA*, 2020, **2**(4): 505-518. DOI: 10.1002/edn3.75.

[93] Valentin RE, Kyle KE, Allen MC *et al*. The state, transport, and fate of aboveground terrestrial arthropod eDNA. *Environmental DNA*, 2021, **3**(6): 1081-1092. DOI: 10.1002/edn3.229.

[94] Eichmiller JJ, Miller LM, Sorensen PW. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular Ecology Resources*, 2016, **16**(1): 56-68. DOI: 10.1111/1755-0998.12421.

[95] Li J, Lawson Handley LJ, Read DS *et al*. The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 2018. DOI: 10.1111/1755-0998.12899.

[96] Majaneva M, Diserud OH, Eagle SHC *et al*. Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Scientific Reports*, 2018, **8**: 4682. DOI: 10.1038/s41598-018-23052-8.

[97] Djurhuus A, Pitz K, Sawaya NA *et al*. Evaluation of marine zooplankton community structure through environmental DNA metabarcoding. *Limnology and Oceanography*, *Methods*, 2018, **16**(4): 209-221. DOI: 10.1002/lom3.10237.

[98] He XP, Sutherland TF, Abbott CL. Improved efficiency in eDNA metabarcoding of benthic metazoans by sieving sediments prior to DNA extraction. *Environmental DNA*, 2021, **3**(4): 716-726. DOI: 10.1002/edn3.172.

[99] Goldberg CS, Turner CR, Deiner K *et al*. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 2016, **7**(11): 1299-1307. DOI: 10.1111/2041-210x.12595.

[100] Yamanaka H, Minamoto T, Matsuura J *et al*. A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. *Limnology*, 2017, **18**(2): 233-241. DOI: 10.1007/s10201-016-0508-5.

[101] Sales NG, Wangensteen OS, Carvalho DC *et al*. Influence of preservation methods, sample medium and sampling time on eDNA recovery in a neotropical river. *Environmental DNA*, 2019, **1**(2): edn3.14. DOI: 10.1002/edn3.14.

[102] Casey JM, Ransome E, Collins AG *et al*. DNA metabarcoding marker choice skews perception of marine eukaryotic biodiversity. *Environmental DNA*, 2021, **3**(6): 1229-1246. DOI: 10.1002/edn3.245.

[103] Giebner H, Langen K, Bourlat SJ *et al*. Comparing diversity levels in environmental samples: DNA sequence capture and metabarcoding approaches using 18S and COI genes. *Molecular Ecology Resources*, 2020, **20**(5): 1333-1345. DOI: 10.1111/1755-0998.13201.

[104] Zhang S, Zhao JD, Yao M. A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish. *Methods in Ecology and Evolution*, 2020, **11**(12): 1609-1625. DOI: 10.1111/2041-210x.13485.

[105] Sommeria-Klein G, Zinger L, Coissac E *et al*. Latent Dirichlet Allocation reveals spatial and taxonomic structure in a DNA-based census of soil biodiversity from a tropical forest. *Molecular Ecology Resources*, 2020, **20**(2): 371-386. DOI: 10.1111/1755-0998.13109.

[106] Elbrecht V, Braukmann TWA, Ivanova NV *et al*. Validation of COI metabarcoding primers for terrestrial arthropods. *PeerJ*, 2019, **7**: e7745. DOI: 10.7717/peerj.7745.

[107] Collins RA, Bakker J, Wangensteen OS *et al*. Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with COI. *Methods in Ecology and Evolution*, 2019, **10**(11): 1985-2001. DOI: 10.1111/2041-210x.13276.

[108] Luo JH, Tao Y, Xing P *et al*. Mini-review: Advances of metagenomics research for lake microbiomes. *J Lake Sci*, 2020, **32**(1): 271-280. DOI: 10.18307/2020.0125. [罗建桦, 陶晔, 邢鹏等. 湖泊微生物宏基因组学研究进展. 湖泊科学, 2020, **32**(1): 271-280.]

[109] Dopheide A, Xie D, Buckley TR *et al*. Impacts of DNA extraction and PCR on DNA metabarcoding estimates of soil biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 2019, **10**(1): 120-133. DOI: 10.1111/2041-210x.13086.

[110] Armbrecht L, Herrando-Pérez S, Eisenhofer R *et al*. An optimized method for the extraction of ancient eukaryote DNA from

marine sediments. *Molecular Ecology Resources*, 2020, **20**(4): 906-919. DOI: 10.1111/1755-0998.13162.

[111] Hermans SM, Buckley HL, Lear G. Optimal extraction methods for the simultaneous analysis of DNA from diverse organisms and sample types. *Molecular Ecology Resources*, 2018, **18**(3): 557-569. DOI: 10.1111/1755-0998.12762.

[112] Ravindran S. Turning discarded DNA into ecology gold. *Nature*, 2019, **570**(7762): 543-545. DOI: 10.1038/d41586-019-01987-w.

[113] Nichols RV, Vollmers C, Newsom LA *et al*. Minimizing polymerase biases in metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 2018: 2018May24. DOI: 10.1111/1755-0998.12895.

[114] Antich A, Palacin C, Wangensteen OS *et al*. To denoise or to cluster, that is not the question: Optimizing pipelines for COI metabarcoding and metaphylogeography. *BMC Bioinformatics*, 2021, **22**(1): 177. DOI: 10.1186/s12859-021-04115-6.

[115] Kopylova E, Navas-Molina JA, Mercier C *et al*. Open-source sequence clustering methods improve the state of the art. *mSystems*, 2016, **1**(1): e00003-e00015. DOI: 10.1128/mSystems.00003-15.

[116] Peng XY, Dorman KS. AmpliCI: A high-resolution model-based approach for denoising Illumina amplicon data. *Bioinformatics*, 2020, **36**(21): 5151-5158. DOI: 10.1093/bioinformatics/btaa648.

[117] Yan HG, Dong ZL, Ma TT *et al*. Detection and biomass assessment of *Procypris rabaudi* based on environmental DNA. *Journal of Fisheries of China*, 2022, **46**(6): 1018-1026. [闫卉果，董智玲，马婷婷等．基于环境DNA的岩原鲤检测及生物量评估．水产学报, 2022, **46**(6): 1018-1026.]

[118] Capo E, Spong G, Koizumi S *et al*. Droplet digital PCR applied to environmental DNA, a promising method to estimate fish population abundance from humic-rich aquatic ecosystems. *Environmental DNA*, 2021, **3**(2): 343-352. DOI: 10.1002/edn3.115.

[119] Shen YJ, Hubert N, Huang Y *et al*. DNA barcoding the ichthyofauna of the Yangtze River: Insights from the molecular inventory of a mega-diverse temperate fauna. *Molecular Ecology Resources*, 2019, **19**(5): 1278-1291. DOI: 10.1111/1755-0998.12961.

[120] Wang M, Yuan Y, Yu H *et al*. Construction of Barcode Library of Freshwater Macroinvertebrate in China. *Environmental Monitoring of China*, 2022, **38**(1): 36-44. DOI: 10.19316/j.issn.1002-6002.2022.01.04. [王萌，苑艺，于海燕等．中国淡水大型底栖无脊椎动物条形码数据库构建．中国环境监测, 2022, **38**(1): 36-44.]

[121] Plante F, Bourgault P, Dubois Y *et al*. Environmental DNA as a detection and quantitative tool for stream-dwelling salamanders: A comparison with the traditional active search method. *Environmental DNA*, 2021, **3**(6): 1128-1141. DOI: 10.1002/edn3.233.

[122] Allen MC, Nielsen AL, Peterson DL *et al*. Terrestrial eDNA survey outperforms conventional approach for detecting an invasive pest insect within an agricultural ecosystem. *Environmental DNA*, 2021, **3**(6): 1102-1112. DOI: 10.1002/edn3.231.

[123] Berry O, Jarman S, Bissett A *et al.*. Making environmental DNA (eDNA) biodiversity records globally accessible. *Environmental DNA*, 2021, **3**(4): 699-705. DOI: 10.1002/edn3.173.

[124] Sehnal L, Brammer-Robbins E, Wormington AM *et al*. Microbiome composition and function in aquatic vertebrates: Small organisms making big impacts on aquatic animal health. *Frontiers in Microbiology*, 2021, **12**: 567408. DOI: 10.3389/fmicb.2021.567408.

[125] Sun FL, Wang CZ, Chen LJ *et al*. The intestinal bacterial community of healthy and diseased animals and its association with the aquaculture environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, **104**(2): 775-783. DOI: 10.1007/s00253-019-10236-z.

[126] Tong Q, Cui LY, Du XP *et al*. Comparison of gut *Microbiota* diversity and predicted functions between healthy and diseased captive *Rana dybowskii*. *Frontiers in Microbiology*, 2020, **11**: 2096. DOI: 10.3389/fmicb.2020.02096.

[127] Sun FL, Xu ZT. Significant differences in intestinal microbial communities in aquatic animals from an aquaculture area. *Journal of Marine Science and Engineering*, 2021, **9**(2): 104.

[128] Kuang TX, He AY, Lin YF *et al*. Comparative analysis of microbial communities associated with the gill, gut, and habitat of two filter-feeding fish. *Aquaculture Reports*, 2020, **18**: 100501. DOI: 10.1016/j.aqrep.2020.100501.

[129] Zhou L, Qu YY, Qin J *et al*. Deep insight into bacterial community characterization and relationship in the pond water, sediment and the gut of shrimp (*Penaeus japonicus*). *Aquaculture*, 2021, **539**: 736658. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.736658.

[130] Zhang XC, Li XH, Lu JQ *et al*. Quantifying the importance of external and internal sources to the gut microbiota in juvenile and adult shrimp. *Aquaculture*, 2021, **531**: 735910. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735910.

[131] Trujillo-González A, Villacorta-Rath C, White NE *et al*. Considerations for future environmental DNA accreditation and proficiency testing schemes. *Environmental DNA*, 2021, **3**(6): 1049-1058. DOI: 10.1002/edn3.243.

[132] Maasri A, Jaehnig SC, Adamescu MC *et al.* A global agenda for advancing freshwater biodiversity research. *Ecology Letters*, 2022, **25**(2): 255-263. DOI: 10.1111/ele.13931.

[133] Michener WK, Jones MB. Ecoinformatics: Supporting ecology as a data-intensive science. *Trends in Ecology & Evolution*, 2012, **27**(2): 85-93. DOI: 10.1016/j.tree.2011.11.016.